التضاد الحيوي للبكتريا *Bacillus subtilis* على المسببات المرضية الفطرية في التربة

آمال عباس محمد الفخري
قسم علوم الحياة – كلية العلوم للبنات – جامعة بغداد

المستخلص

أجريت هذه الدراسة الأولية لمعرفة التأثير التضادي للبكتريا *Bacillus subtilis* ضد بعض فطريات التربة الممرضة للنبات داخل المختبر. عند تنمية البكتريا مع الفطريات على الوسط الزرعي N.A. كانت أقطار المستعمرات الفطرية (38 و44 و38.6) ملم مقارنة بمعاملة السيطرة (57 و62.3 و50) ملم للفطريات *Rhizoctonia solani* و*Fusarium solani* و*F.oxysporum* على التوالي، كما أحدثت نسب تثبيط بلغت (34 و30 و23)% للفطريات نفسها أعلاه. أما على الوسط PDA فبلغت (47.8 و48.3 و46.6) ملم والسيطرة (57.6 و61 و64.3) ملم على التوالي،كما بلغت نسب التثبيط (17 و22 و28)% بالتتابع. ظهر التأثير معنويا على كلا الوسطين ،كما اظهر راشح البكتريا تأثيرا معنويا أيضا وبلغ معدل قطر المستعمرة 4.5 ملم و0.5 ملم عند التركيز 10% وللفطرين *R .solani* و*F.solani* على التوالي ، أما عند التركيز 20% فقد بلغ 1.8ملم للفطر *R .solani* في حين ثبط نمو الفطر *F.solani* تماما عند هذا التركيز. تراوحت النسبة للتثبيط بين 91.6 و99.3 % عند التركيز10% و96.3 و100 % عند التركيز20% لكل من الفطرين *R .solani* و*F.solani* بالتتابع.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences, 36(3) : 7 - 12, 2005 Al-Fakhri

THE ANTAGONISTIC EFFECT OF *BACILLUS SUBTILIS* AGAINST CERTAIN SOIL BORNE FUNGI

A. A. M. Al-Fakhri
College of Sciences for Women – University of Baghdad

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the antagonistic effect of *Bacillus subtilis* against three pathogenic soil borne fungi *in vitro*, under laboratory condition. The diameters of the fungal colonies on nutrient agar were (38, 44, 38.6)mm comparing with control (57, 62.3, 50)mm for *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* and *F.oxysporum*, respectively. The inhibition percentages were 34, 30, 23 % for the fungi , respectively. The colony diameters on PDA were (47.8,48.3,46.6)mm whereas the colonies of the control were (61, 57.6, 64.3) mm diameters , respectively and the percentages of inhibition were (22, 17,28)% , respectively. The effect was highly significant on both media .The use of bacterial extraction revealed a significant effect on the growth of *R .solani* and *F.solani* which were 4.5 and 0.5 mm , respectively with 10% concentration .The growth of *R .solani* was 1.8 mm whereas the growth of *F.solani* was inhibited completely with 20% concentration .The percentage of inhibition was 91.6 and 99.3% with 10%concentration and 96.3 and 100%with 20%concentration for *R .solani* and *F.solani* , respectively.

المقدمة

تعد العديد من فطريات التربة التي تقطن في منطقة حول الجذور من المسببات المرضية المهمة لعدد كبير من النباتات الاقتصادية ، كمرض الذبول الفيوزارمي على القرنفل الذي يسببه الفطر *Fusarium oxysporum* والخسائر الاقتصادية البالغة التي يحدثها سنويا في الولايات المتحدة الأمريكية (15). كما أن أنواع الفطر *Fusarium* مسؤولة عن العفن الجاف للبطاطة حتى تحت ظروف خزن مبردة.

ان أسلوب إدارة المرض باستعمال المواد الكيماوية تعد من الطرائق غير العملية في الوقت الحاضر بسبب ظهور السلالات المقاومة للمبيدات الفطرية فضلا على ظهور المتبقيات الكيماوية في السلسلة الغذائية ومشاكل التلوث البيئي(8 و12)، هنالك عدة أنواع من الأحياء المجهرية استخدمت كمضادات وبشكل تجاري تجاه الفطريات الممرضة للنبات في العديد من دول العالم ، ومن هذه الأحياء :

*تاريخ استلام البحث 2004/10/12 ، تاريخ قبول البحث 2005/3/13

Gliocladium virens G. 21 و*Tricoderma harzianum* KRL-AG2 و182 *Candida oleophla* وكذلك البكتريا *Pseudomonas fluorscens* EG 1053 و*P. Syringea* ESC10 and ESC 11 و_ *Bulkolderia cepacia* و*Bacillus subtilis* GBO3 and MBI 600 (5 و9). فالبكتريا التابعة للجنس *Bacillus* تعد من أحياء التربة والتي تتواجد بصورة عامة حول منطقة الجذور (14). و في بيئات مختلفة كما إن تواجدها وبقائها يعود وبشكل كبير الى تكوينها للابواغ الداخلية (endospores) التي تستطيع مقاومة الأشعة فوق البنفسجية و الجفاف والحرارة والمذيبات العضوية (10).

ان بعض أنواع ال *Bacillus* مثل *B. thuringiensis* و*B. sphaericus* تنتج بعض المركبات ذات التأثير السمي في يرقات الحشرات (10) . كما إن هنالك عدد من التقارير أشارت الى تأثير أنواع من ال *Bacillus* ومن ضمنها ال *B. subtilis* في السيطرة على العفن الأخضر وعفن قواعد السيقان على الحمضيات (13).

أشار Montealegre واخرون (10) إلى إن البكتريا *B. subtilis* لها تأثير تضادي ضد الفطر *Rhizoctonia solani* على الطماطم نظرا لانتشار الفطريات *Fusarium oxysporum* و *F. solani* و*Rhizoctonia solani* في الترب ولوجود بعض الدراسات حول مهاجمتها لجذور بعض النباتات الاقتصادية وإحداث الأمراض النباتية عليها (1).

ونظرا لقلة الدراسات في القطر حول استعمال البكتريا *Bacillus subtilis* ضد هذه المجموعة من الفطريات ، أجرينا هذه الدراسة التي هدفت إلى التعرف على تأثير هذه البكتريا في النمو الشعاعي لهذه الفطريات وكذلك معرفة آلية التضاد البكتيري على هذه الفطريات.

المواد وطرائق العمل

عزل الفطريات

(أ)الفطر *Rhizoctonia solani* :

تم عزل هذا الفطر باستخدام قطع من جذور بادرات القرنبيط المصابة بمرض سقوط البادرات (Damping-off) وبعد جلبها إلى المختبر غمرت بمحلول هايبوكلورات الصوديوم 5% لمدة خمس دقائق ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ووضعت في أطباق بتري تحتوي على وسط اكار البطاطة والدكستروز Potato dextrose agar (PDA) وحضنت عند درجة 25 ^{0}م لمدة أربعة أيام ثم فحصت وشخصت حيث تم التأكد ان ما عزل هو الفطر *R.solani* بعد فحصه بالمجهر ومشاهدة الصفات المميزة لهذا الفطر ، بعدها حفظ عند درجة 5ºم.

(ب)الفطر *Fusarium solani*

أستخدمت نماذج من جذور وقواعد سيقان نبات القرنفل المصابة بمرض تعفن جذور وقواعد السيقان تم الحصول عليها من أحد المشاتل في عزل هذا الفطر حيث قطعت النماذج إلى قطع صغيرة بطول 0.5-1 سم، عقمت وغسلت وحضنت بالطريقة المذكورة في الفقرة (أ) ثم شخصت بالاستناد إلى المفتاح التصنيفي (3).

(ج) الفطر *Fusarium oxysporum*

تم الحصول على مزرعة نقية من إحدى العزلات المرضية لهذا الفطر من مختبر الأمراض النباتية التابع لقسم وقاية النبات في كلية الزراعة- جامعة بغداد.

عزل البكتريا *Bacillus subtilis*

عزلت بكتريا التضاد الحيوي من التربة في منطقة الجذور (Rhizosphere) من جذور نباتات الطماطم السليمة أو المصابة وعمل منها معلق بكتيري وذلك بأخذ 1 غم من التربة ووضعها في أنبوبة اختبار حاوية على 10مل ماء مقطر معقم لنحصل على التخفيف10^{-1} ، ومن هذا التخفيف تم نقل 1 مل الى أنبوبة اختبار ثانية وأكمل الحجم الى 10 مل لنحصل على التخفيف10^{-2}، وهكذا كررت العملية للحصول على سلسلة من التخافيف والتي تضمنت 10^{-3}، 10^{-5} و10^{-7} لغرض انتخاب التركيز الملائم ،ثم سحب 0.1 مل من كل تخفيف ووضعت في أطباق بتري معقم قطر 9سم ، بعدها سكبت الأوساط الزرعية NA والـ PDA، وأستخدم ثلاث مكررات لكل معاملة.

حضنت الاطباق في درجة حرارة 25 ^{0}م لمدة 48 ساعة حتى ظهور المستعمرات والتي تم تشخيصها بعد إجراء كافة الاختبارات المجهرية والكيموحيوية عليها وحسبما بينه Gibbons و(4) Buchnan.

التضاد البكتيري الفطري

(أ)على الوسط الزرعي N.A

استخدمت المستعمرة البكتيرية *Bacillus subtilis* بعمر يومين ودرس تداخلها مع الفطريات *F.solani* ، *F. oxysporum* و *R .solani* في أطباق بتري قطر 9 سم حاوية على الأوساط الزرعية Nutrient agar (N A) حيث استعملت طريقة Dual culture technique وذلك بتقسيم الطبق إلى نصفين، زرعت البكتريا في النصف الأول بطريقة التخطيط (Streaking) باستعمال أبرة التلقيح ذات العروة Loop full وفي النصف الثاني من الطبق وضع

قرص من كل فطر قطره 2.5 ملم قطع من المزارع الفطرية بعمر 7 أيام بواسطة الثاقب الفليني ومن ثم رفعه بالابرة ووضعه في مركز النصف الثاني من الطبق وعلى بعد حوالي 2.5 سم من حافات المزرعة البكتيرية ،أما معاملة السيطرة فقد وضع القرص في مركز النصف الثاني من الطبق ،أما النصف الأول من الطبق فترك دون أن يلقح بالبكتريا ، عملت ثلاث مكررات لكل معاملة وبعد 6 أيام من زرع الفطريات قيست أقطار المستعمرات الفطرية ومنها حسبت النسبة المئوية للتثبيط باستخدام المعادلة آلاتية حسبما أوضحها Montealegre واخرون (10):

%للتثبيط=[1- (قطر النمو الفطري لمعاملة البكتريا/قطر النمو الفطري لمعاملة السيطرة)] × 100

(ب)على الوسط الزرعي PDA

اتبعت نفس خطوات العمل المبينة في الفقرة (أ) أعلاه .وتم قياس النمو الفطري والنسبة المئوية للتثبيط .

استخلاص الراشح البكتيري

1-تم تلقيح الوسط الزرعي السائل Nutrient browth (NB) ببكتيريا ال *Bacillus subtilis* ورج الوسط جيدا لكي تتوزع الخلايا البكتيرية بانتظام .

2-تم اجراء سلسلة من التخافيف العشرية وذلك عن طريق نقل 1 مل من الوسط الملقح بواسطة ماصة معقمة الى أنبوبة اختبار تحتوي على 9 مل ماء مقطر معقم لنحصل على التخفيف 10^{-1} ومن هذا التخفيف تم نقل 1 مل الى انبوبة اختبار ثانية وأكمل الحجم الى 10 مل لنحصل على التخفيف 10^{-2} وهكذا كررت العملية عدة مرات للحصول على التخافيف 10^{-8} و 10^{-9} . اجريت سلسلة التخافيف هذه من الوسط الملقح بالبكتريا والمحضنة في درجة حرارة25 ^{0}م.

3-بعدها تم نقل 1مل من كل من التخافيف الاخيرة الى اطباق بتري معقمة مع مراعاة تحضير طبقين لكل تخفيف.

4-ثم اضيف الى كل طبق كمية كافية من الوسط الزرعي الصلب Nutrient agar والمبردة الى درجة حرارة 45 ^{0}م ، ثم خلطت محتويات كل طبق جيدا وذلك بتحريك الطبق بشكل رقم(8)، بعدها تركت الاطباق لتتصلب.

5-وضعت الاطباق بالحاضنة بوضع مقلوب في درجة 25 ^{0}م لليوم التالي.

6-أنتخب التخفيف المناسب الذي يظهر عدد من المستعمرات يتراوح بين (30-300) مستعمرة بالطبق الواحد،ثم تم حساب متوسط عدد المستعمرات بالطبق الواحد.

واخيرا تم حساب عدد الخلايا في 1 مل وذلك بضرب متوسط عدد المستعمرات في مقلوب التخفيف المستعمل، عدل تركيز اللقاح ليصبح $5x10^9$ وحدة خلية بكتيرية لكل 1مل ، حضر منها 100 مل في الوسط الزرعي السائل Nutrient browth (N B) بعدها وزعت على انابيب النبذ المركزي وحضنت في درجة حرارة 25 ^{0}م لمدة 48 ساعة (10) .

7-نبذت مركزيا بمقدار 6000 دورة بالدقيقة ،أهمل الراسب ثم مرر الراشح خلال ورق ترشيح قطر 0.2 ملي مايكرون (Millipore) بمساعدة جهاز التفريغ الهوائي ،أخذ الراشح وأضيف الى الوسط PDA بتركيز 10%، 20% وذلك بأخذ 10 و20 مل من الراشح وأكمل الحجم الى 100 مل على التوالي ،صبت في أطباق بتري قياس 9 سم وبواقع ثلاث مكررات لكل تركيز اضافة الى معاملة السيطرة التي تركت دون اضافة الراشح.

8-زرع قرص قطره 2.5 ملم من كل من الفطرين *Fusarium solani* و *Rhizoctonia solani* في مركز الطبق ،حضنت الاطباق لمدة خمسة أيام في درجة 25 ^{0}م ، ثم أخذت النتائج بقياس متوسط القطرين المتعامدين من كل مستعمرة فطرية.

نفذت التجربة باستخدام التصميم تام التعشية وحللت النتائج احصائيا باستخدام اختبارt واختبار دنكن متعدد الحدود.

النتائج والمناقشة

تأثير الخلايا البكتيرية في النمو الفطري :

عند تنمية البكتريا والفطريات على الوسط الزرعي N.A أظهرت النتائج تأثيرا واضحا للبكتريا *Bacillus subtilis* في النمو الشعاعي للفطريات *R .solani* و *F.solani* و *F.oxysporum* مقارنة بمعاملة السيطرة، وقد كانت الفروق عالية المعنوية باحتمال 0.01 لجميع هذه الفطريات ،كما أحدثت هذه البكتريا نسب تثبيط تراوحت بين 23% و34 % غير أن الفروق في نسب التثبيط لم تكن معنوية بين هذه الفطريات (جدول1). أما على الوسط PDA فقد أظهرت البكتريا تأثيرا معنويا عاليا باحتمال0.01 للفطر *R .solani* وتأثيرا معنويا باحتمال 0.05 للفطر *F. oxysporum* ، أما بالنسبة للفطر *F. solani* فلم يكن التأثير معنويا من الناحية الإحصائية ،كما أحدثت

البكتريا نسب تثبيط تراوحت بين 17 % و28% غير أن الفروق في نسب التثبيط بين الفطريات الثلاث لم تكن معنوية (جدول 2).

جدول 1. تأثير بكتريا التضاد الحيوي *Bacillus subtilis* في نمو فطريات الدراسة على الوسط(N.A)

اسم الفطر	النمو الشعاعي للفطر(ملم) معاملة التضاد	النمو الشعاعي للفطر(ملم) (معاملة السيطرة)	%لتثبيط النمو الشعاعي
R .solani	38 **	57	34 a
F.solani	44 **	62.3	30 a
F.oxysporum	38.6 **	50	23 a

** معنوية باحتمال0.01.

الحروف المتشابهة تعني عدم وجود فروق معنوية.

جدول 2. تأثير بكتريا التضاد الحيوي*Bacillus subtils* في نمو فطريات الدراسة على الوسط PDA

اسم الفطر	النمو الشعاعي للفطر(ملم) (معاملة التضاد)	النمو الشعاعي للفطر(ملم) (معاملة السيطرة)	%للتثبيط
R .solani	47.8 **	61	22 a
F. solani	48.3 NS	57.6	17 a
F .oxysporum	46.6 *	64.3	28 a

*معنوية باحتمال 0.05

**معنوية باحتمال 0.01 و NS غير معنوية

الحروف المتشابهة تعني عدم وجود فروق معنوية.

خلص الراشح البكتيري في النمو الفطري

أشارت نتائج الدراسة الموضحة في جدول(3) إلى أن لراشح البكتريا *Bacillus subtilis* تأثيرا واضحا في النمو الشعاعي للفطرين *R . solani* و *F solani*. وفي النسبة المئوية لتثبيط نموهما، فبالنسبة للنمو الشعاعي ظهر انحسارا واضحا لنمو الفطرين والذي بلغ (1.8 و4.5) ملم عند التركيزين 10% و20%على التوالي للفطر *R .solani* و(0.5 و0) ملم عند التركيزين 10% و20% على التوالي للفطر *F.solani*، أما من حيث نسب التثبيط فقد تراوحت بين 91.6 %و99.3 %عند التركيزين 10 %و 20% على التوالي للفطر *R .solani* و96.3%و 100%عند التركيزين 10 % و20% على التوالي بالنسبة للفطر *F.solani*.

كانت الفروق معنوية جدا باحتمال 0.01 بين معاملة كل تركيز ومعاملة السيطرة لكلا الفطرين ،كما ظهرت فروق معنوية جدا بين التركيزين 10% و20% و معاملة السيطرة في نسبة تثبيط الفطر *R solani*. ،وقد حصل فرق معنوي أيضا بين نسبتي التثبيط للفطر *R .solani*، اما الفطر *F.solani* فلم يكن هناك فرق معنوي بين التركيزين 10%و20%،ولكن كان هناك فرق معنوي بين كل من التركيزين المذكورين ومعاملة السيطرة.

جدول 3. تأثير راشح البكتريا *Bacillus subtilis*في تثبيط نمو الفطرين *R.solani* و*F.solani*

اسم الفطر	التركيز	معدل قطر المستعمرة (ملم)	% للتثبيط
R .solani	0	51.6c	0
	10	4.5b	91.6a
	20	1.8a	99.3b
F.solani	0	44b	0
	10	0.5a	96.3b
	20	0a	100b

الحروف المختلفة ضمن الفطر الواحد تعني وجود فروق معنوية

النتائج التي أوضحتها هذه الدراسة تؤكد التأثير التثبيطي للبكتريا *Bacillus subtilis* ضد عدد من الفطريات الممرضة للنبات وقد كان هذا التثبيط على مستوى المزرعة البكتيرية الكاملة من جهة وعلى مستوى الراشح البكتيري من جهة أخرى ، فقد أظهرت الأطباق الملقحة بالبكتريا مع الفطر على الوسط N.A وجود هالة واضحة وتثبيطا معنويا في نمو الفطريات الثلاث *F.solani*، *R .solani* و *F.oxysporum*، حيث لم يحصل أي تلامس بين البكتريا وكل من هذه الفطريات الثلاث حتى بعد 7 أيام من عملية التلقيح وهذا يعني ان الية التضاد antagonistic mechanisim تتمثل بافراز البكتريا للايضات الانتشارية والطيارة وهذا ما أكده Perez واخرون (11) .

ان ظهور الحالة التثبيطية عزز الاعتقاد بأن البكتريا قد أفرزت أيضات مثبطة للفطريات Fungi static metabolites حيث أشارت دراسات سابقة بأن البكتريا *B.subtilis* تستطيع أن تفرز عدة أيضات مضادة للفطريات مثل bacitracin، subtiline ، bacillin و bacillomycin والتي تعود إلى مجموعة الـIturine(2) .

من خلال الجدولين 1 و2 يتضح أن نسب التثبيط على الوسط PDA أقل مما هي عليه على الوسط N.A ربما يعود السبب الى كون الوسط PDA أكثر ملائمة لنمو فطريات الدراسة من الوسط N.A ومع ذلك فقد أظهرت البكتريا وراشحها تثبيطا معنويا ضد فطريات الدراسة الثلاث على الوسط PDA.

توفر أنواع البكتريا *Bacillus* منافع عديدة من بين بقية البكتريا، وذلك بسبب قدرتها على البقاء لمدة طويلة وقابليتها على تكوين الابواغ الداخلية endospores ونشاطها الواسع في إنتاج المضادات الحياتية (6) .

المصادر

1-الناصري ، سارا قحطان سليمان. 2001. المقاومة الإحيائية لبعض فطريات تعفن جذور القرنفل وموتها بواسطة أنواع الفطر *Tricoderma*. رسالة ماجستير- كلية العلوم للبنات –جامعة بغداد. 2001.

2-Alippi , A. and C. Monaco 1994. Antagonismo *in vitro* de species de *Bacills* contra *Seclerotium* rolsiiy *Fusarium solani* .Revesta de la Faculted de Agronomia, La plato. 70 : 91-95.

3-Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew Surrey England. 237 pp.

4-Buchnan. R. E. and N. E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

5-El-Ghaouth A ., L. W. Charles and M. Wisniewski. 1998. Ultrastructural and cyto chemical aspects of the biological control of *Botrytis cineria* by *Candida sanitoana* in apple fruit. Phytopathology 88 : 282-291.

6-Fiddman P. J. and S. Rossall. 1995. Selection of bacterial antagonists for the biological control of *Rhizoctonia solani* in oil seed rape (*Brassica napus*). Plant Pathology 44: 695-703.

7-Filippi C., Bagnoli G. and G. Picci. 1992. Preliminary studies on the antimycotic activity of a molecule secreted by *Bacillus subtilis* M 51. Agricultural mediterranea 122:164-169.

8-Kawchuck, L. M., J. D. Holly, D. R. Lynch and R. M. Clear. 1994. Resistanse to thiabendazole and thiophanate–methyle in Canadian isolates of *Fusarium sambucinum* and *Helmithosporium solani* . American Potato Journal 71:185-192.

9-Kim, D. S., R. J. Cook and D. M. Weler. 1997. *Bacillus* sp .L 32492 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. Phytopathology 87: 551-558.

10-Montealegre, J. R., R. Reyes, R. L. M. Peres, R. Herrera, P. Silva and X. Besoain. 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. Environmental Biotechnology 6(2) .

11-Perez, L. M., X. Besoain, M. Reyes, G. Pardo and J. Montealegre. (2002) The expression of extracellular fungal cell wall hydrolytic enzymes in different *Tricoderma harzianum* isolates correlate with their ability to control *Pyrenochaeta lycopersici*. Biological Research 35(3): 401 - 410.

12-Secor, G. A., J. Rodriguez and N.C. Gudmested. 1994. Distribution and incidence of benzimidazole-resistant *Fusarium sambucinumd* and *Helminthosprium solani* isolated from potato in North America. In: BCPC Monograph 60: Fungicide resistance, British Crop Protection Council, England, pp. 271-274.

13-Singh V. and B. J. Deverall. 1984. *Bacillus subtilis* as a control agent against

fungal pathogens of citrus fruit. Transactions of British Mycological Society 83 : 487-490.

14-Walker R., A. A. Powel and B. Seddon. 1998. Bacillus isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cineria* and *Pythium* species . Journal of Applied Microbiology 84: 791-801.

15-Yuen, G. Y., M. N. Schroth and A. H. Maccain. 1985. Reduction of fusarium wilt of carnation with suppressive soil and antagonistic bacteria . Plant Disease 69: 1071-1075.